

针叶小爪螨板栗和杉木种群间的遗传分化和杂交试验

尹淑艳¹, 于新社², 郭慧玲³, 孙绪艮^{1,*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018; 2. 泰安市徂徕山林场, 山东泰安 271000; 3. 泰山管委会, 山东泰安 271000)

摘要: 为明确针叶小爪螨 *Oligonychus ununguis* (Jacobi) 山东板栗种群和浙江杉木种群的遗传分化程度, 本研究对其基因序列(线粒体 CO I 和核糖体 ITS2)进行了比较, 并通过杂交试验测定了两者间的杂交亲和性。采用 PCR 产物直接测序法获得 410 bp 的 CO I 片段及 469 bp(板栗种群)和 513 bp(杉木种群)的完整 ITS2 序列, CO I 及 ITS2 序列在两种种群间的差异分别为 10.5%~10.8% 和 15.2%~15.7%。杂交试验表明两种种群间存在完全的生殖隔离。根据两者间的序列差异和杂交结果, 初步认为山东板栗和浙江杉木上的小爪螨可能是两个不同的种。

关键词: 针叶小爪螨; 板栗种群; 杉木种群; CO I; ITS2; 生殖隔离; 杂交试验

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)05-0555-09

Genetic differentiation and cross-breeding experiments between *Oligonychus ununguis* (Acari: Tetranychidae) populations from host plants *Castanea mollissima* and *Cunninghamia lanceolata*

YIN Shu-Yan¹, YU Xin-She², GUO Hui-Ling³, SUN Xu-Gen^{1,*} (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Forest Farm of Mount Culai, Tai'an, Shandong 271000, China; 3. Mount Tai Administration Committee, Tai'an, Shandong 271000, China)

Abstract: To determine the differentiation degree within the spruce spider mites, *Oligonychus ununguis* (Jacobi), two populations of the mite on chestnut *Castanea mollissima* from Shandong Province and on fir *Cunninghamia lanceolata* from Zhejiang Province were used for analyzing the sequence variation of the second internal transcribed spacer 2 (ITS2) of nuclear ribosomal DNA and part of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (CO I). The reproductive compatibility between the two populations was examined through cross-breeding experiments. The results indicated that ITS2 gene from chestnut and fir individuals is 469 bp and 513 bp in length, respectively. Nucleotide divergence of ITS2 gene was 15.2%–15.7% between the two populations. The mites collected from chestnut differed from those collected from fir by 10.5%–10.8% of the nucleotide divergence in CO I sequences. Cross-breeding experiments between the two populations displayed their completely reproductive incompatibility. Therefore, the tested mite populations are probably two different species according to the divergences of DNA sequences and reproductive isolation between them.

Key words: *Oligonychus ununguis*; chestnut population; fir population; CO I; ITS2; reproductive isolation; cross-breeding experiment

针叶小爪螨 *Oligonychus ununguis* (Jacobi) 俗称板栗红蜘蛛、杉木红蜘蛛, 属叶螨科 (Tetranychidae), 小爪螨属 *Oligonychus*, 1905 年由 Jacobi 采自德国云杉上的标本定名为 *Tetranychus ununguis* Jacobi, 1955 年由 Pritchard 和 Baker 修订

为现名。该螨广泛分布在亚洲、欧洲、澳洲、美洲的众多国家。据已有资料记载, 其寄主植物达 65 种以上, 包括松科 (Pinaceae)、柏科 (Cupressaceae)、杉科 (Taxodiaceae) 等针叶树和壳斗科 (Fagaceae) 等阔叶树 (Shinkaji, 1975a, 1975b;

基金项目: 教育部博士点科研基金(20060434)

作者简介: 尹淑艳, 女, 1973 年生, 讲师, 博士研究生, 主要从事植物-昆虫(螨)-天敌间关系的研究, E-mail: shuyanyan@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xgsun@sdau.edu.cn

收稿日期 Received: 2009-11-05; 接受日期 Accepted: 2010-04-01

王慧芙, 1981; Wanibuchi and Saito, 1983; 王源岷等, 1989; 孙绪良和苗良, 1990; 孙绪良等, 1995, 2000, 2002; Richmond, 1996; Przygoda, 2001; Puchalska, 2002; 孙绪良和尹淑艳, 2002; Czajkowska *et al.*, 2003; Shrewsbury and Hardin, 2003; Czajkowska and Ewa, 2005; Kiekiewicz *et al.*, 2005; Puchalska *et al.*, 2006, 2008; 刘学辉等, 2007; 卢向阳等, 2008)。该螨在我国北方是板栗 *Castanea mollissima* 的重要害螨, 严重影响板栗的产量及品质(孙绪良等, 1994); 浙江、安徽、江西等地, 杉木 *Cunninghamia lanceolata* 受害较重(张时敏, 1983)。孙绪良等自 20 世纪 90 年代起较为系统地研究了该螨的个体生态、种群生态、化学生态(孙绪良和苗良, 1990; 孙绪良等, 1994, 1995, 2000, 2002; 孙绪良和尹淑艳, 2002; 尹淑艳和孙绪良, 2002), 发现该螨的板栗种群与杉木种群在寄主植物种类上存在着较大差异, 不能互相在对方的寄主上正常生存, 而且两种群有显著的不亲和性(孙绪良等, 2000)。

准确的物种鉴定是有效防治有害生物的基础。叶螨分类学传统上应用的是形态特征, 但形态鉴定相对来说比较难, 因为叶螨体型微小, 可用于鉴定的特征有限, 且主要特征经常表现出很大的表型可塑性, 以至于单靠外部形态鉴定的物种有时不准确。此外, 为了准确鉴定, 许多种类都需要两性个体, 且需要有经验的专家观察显微形态。例如, 在日本, 叶螨属有 10 个种, 能通过雌成螨形态鉴定的只有 2 个种, 其他 8 个种需通过显微观察雄螨外生殖器的阴茎形状才能鉴定(Vera *et al.*, 2007)。随着分子技术的发展, 目前 DNA 数据已被比较普遍地应用于任何分类水平上的遗传变异的检测以及生物间关系的确定。螨类进化研究中比较常用的分子标记是线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 和核糖体 DNA 第二内转录间隔区(ITS2)。分子标记有助于区别形态上非常近似的种, 如 Anderson 和 Trueman(2000)通过表型和生殖变异以及 CO I 序列多态性的研究, 证明雅氏瓦螨 *Varroa jacobsoni* Oudemans 至少是 2 个不同种的复合体, 作者建议建立一个新种 *V. destructor*; 在甲螨亚目中, 线粒体 CO I 基因片段的分析帮助确定了 *Steganacarus magnus* 和 *S. anomalus* 的分类地位, 证明二者是同物异名(Salomone *et al.*, 1996)。有关植绥螨科(Phytoseiidae)、叶螨科(Tetranychidae)、牯螨科(Listrophoridae)和根螨亚科(Rhizoglyphinae)等类群的研究表明, ITS2 序列具有物种水平的差异,

可以用来区分近缘种、复合种(Gotoh *et al.*, 1998; Navajas *et al.*, 1998, 1999, 2001; Vargas *et al.*, 2005; Noge *et al.*, 2005; Ben-David *et al.*, 2007)。

为了明确针叶小爪螨不同种群间的遗传分化程度, 本研究比较分析了其山东板栗种群和浙江杉木种群的 CO I 和 ITS2 序列, 并进行了两个种群间的杂交试验。

1 材料与方法

1.1 材料

针叶小爪螨杉木种群(缩写 CL)和板栗种群(缩写 CM)分别采自浙江省富阳市(E119°97', N30°05')和山东省泰安市(E117°09', N36°20')。用于 DNA 分析的, 置于无水乙醇中, 在 -20℃ 保存; 用于杂交试验的分别用盆栽杉木苗和叶片水盘法饲养(孙绪良等, 1995)。

1.2 DNA 提取

从单头雌成螨中提取总 DNA, 方法参照游中华等(2007), 稍加改变, 即: 将单头雌成螨浸入蒸馏水中除去酒精, 移入 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中浸泡 1 h, 然后将虫体转移至 200 μ L 提取液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, pH 8.0)中充分研磨; 加入 2.5 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL)于研磨后的匀浆液中, 混匀后于 57℃ 水浴中消化 3 h; 加等体积苯酚/氯仿(1:1)于反应混合液中, 混匀, 离心 10 min (4℃, 10 000 r/min)。吸取上清用等体积氯仿按上法再抽提一次。吸取上清, 用 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积 100% 冰冻乙醇沉淀 1~3 h 后, 离心 30 min (4℃, 12 000 r/min), 弃上清, 晾干后用 50 μ L 无菌双蒸水溶解, 该 DNA 溶液保存在 -20℃, 用于 PCR 扩增。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 所用引物: ITS2: 1. 5'-GTCTTTTCCGAGG TCACATC-3'; 2. 5'-GGGTAACCTCACCTGATCTG-3' [根据其他叶螨 ITS2 两端的保守序列(5.8S 和 28S)设计]; CO I: 1. 5'-TGATTTTTTGTCACCCA GAAG-3'; 2. 5'-TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3' (Navajas *et al.*, 1998)。

所有引物均由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.3.2 PCR 反应体系及条件: CO I: 采用 25 μ L 标准反应体系, 其中含有 2 μ L DNA 溶液, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR 聚合酶缓冲液, 0.5 μ L (10 mmol/L) dNTP 混合液, 引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, Taq 聚

合酶(2.5 U/ μ L, 北京全式金生物技术有限公司) 0.5 μ L, 超纯水 18.5 μ L。反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 45℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 重复 35 个循环后 72℃ 保温 10 min。

ITS2: 采用 25 μ L 标准反应体系, 其中含有 4 μ L DNA 溶液, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR 聚合酶缓冲液, 0.5 μ L (10 mmol/L) dNTP 混合液, 引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, Taq 聚合酶 (2.5 U/ μ L, 北京全式金生物技术有限公司) 0.2 μ L, 超纯水 16.8 μ L。反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 48℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后 72℃ 保温 10 min。

扩增产物用含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 测序和序列分析

PCR 产物的纯化与测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。为提高序列的精确度采用正反链双向测序。

序列使用 BioEdit (Version 7.0) 软件中的 ClustalW 进行比对, 辅以人工校正, 并用该软件中的 Alignment 计算序列相似性。用 MEGA4.0 进行序列碱基组成分析, 基于 Kimura-2-Parameter 模型计算遗传距离, 采用非加权配对算数平均法 (UPGMA)、邻接法 (NJ) 及最小进化法 (ME) 构建系统树, 系统树各分支的置信度 (bootstrap) 均进行 1 000 次的重复检验。

1.5 杂交试验

在第 2 若螨阶段, 从室内饲养的种群中收集雌螨, 然后将其单头转移到约 4 cm² 的叶盘 (板栗) 或约 4 cm 长的水插枝条 (杉木) 上, 与同一种群或不同种群的 1 头雄成螨放在一起。待雌成螨产卵 5 d 后去除雌雄成螨, 统计产卵量。每天检查叶盘 (枝条) 上的卵量, 幼若螨的存活情况, 直至所有个体发育至成螨, 计算孵化率、幼若螨的死亡率和性比。以种群内杂交作为对照。每处理和对照测试对数见表 3。

因为板栗和杉木上的针叶小爪螨相互交换寄主后, 均不能正常完成个体发育, 另外, 杉木种群雌螨与板栗种群雄螨在板栗叶片上杂交, 雌螨不产卵 (可能与雌螨不取食板栗叶片、产卵前期未补充营养有关) (孙绪良等, 2000), 因此, 本实验所有的杂交是在雌螨的原寄主上进行的, 即板栗种群雌螨与板栗、杉木种群雄螨的杂交在板栗叶片上进行, 杉木种群雌螨与杉木、板栗种群雄螨的杂交在杉木

枝条上进行, 以保证雌螨能够正常取食。

1.6 数据统计分析

采用 SPSS 软件 (Version 17.0) 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 ITS2 的分子数据

测定了板栗和杉木上针叶小爪螨各 2 个个体的核糖体 ITS2 及两端序列, 长度分别为 483 bp 和 527 bp (GenBank 登录号为 GU166391 – GU166394), 去掉两端的保守序列 (5.8S 和 28S), 得到完整的 ITS2 序列, 长度分别为 469 bp 和 513 bp。碱基组成上, 板栗种群的 G + C 平均含量与杉木种群非常接近, 分别为 37.4% 和 37.6%, 与其他叶螨 ITS2 序列的 G + C 含量 (二斑叶螨 *Tetranychus urticae*: 31.2%; *Mononychellus progresivus*: 39%) (Navajas *et al.*, 1998) 无明显差异。对两种群的序列比对发现 31 个变异位点和 7 处、50 个碱基的插入/缺失 (图 1), 二者间的核苷酸差异为 15.2% ~ 15.7%。杉木种群内个体间差异 (1.0%) 比板栗种群 (0.3%) 大 (表 1)。

将本研所得序列联合 GenBank 公布的小爪螨属其他种的相应序列, 包括 *Oligonychus coffeae* (AY750706); *O. mangiferus* (DQ656486); *O. afrasiaticus* (DQ656437); *O. litchii* (EU007692) 和 *O. perseae* (DQ656458), 基于 Kimura-2-Parameter 模型构建 NJ, ME 和 UPGMA 系统树, 这 3 种系统树具有相似的拓扑结构, 在本文中只显示 UPGMA 树 (图 2)。从图中可以看出, 杉木与板栗种群以较高的 Bootstrap 值 (90%) 首先聚在一起, 然后与小爪螨属其他种相聚。

表 1 针叶小爪螨板栗和杉木种群的种群内及种群间 ITS2 序列相似性 (下三角) 及遗传距离 (上三角)

Table 1 The identity (lower triangle) and genetic distance (upper triangle) of ITS2 sequences within and between the chestnut population and the fir population of *Oligonychus ununguis*

	CL1	CL2	CM1	CM2
CL1		0.006	0.070	0.070
CL2	0.990		0.063	0.063
CM1	0.843	0.848		0.002
CM2	0.843	0.848	0.997	

CM 为板栗种群的缩写, CL 为杉木种群的缩写, 缩写后面的数字表示不同的个体; 表 2, 3, 图 1 ~ 3 同。CM is the abbreviation for chestnut population, CL is the abbreviation for fir population, and the numerals following the abbreviation represent different individuals. The same for Table 2, 3 and Figs. 1 – 3.

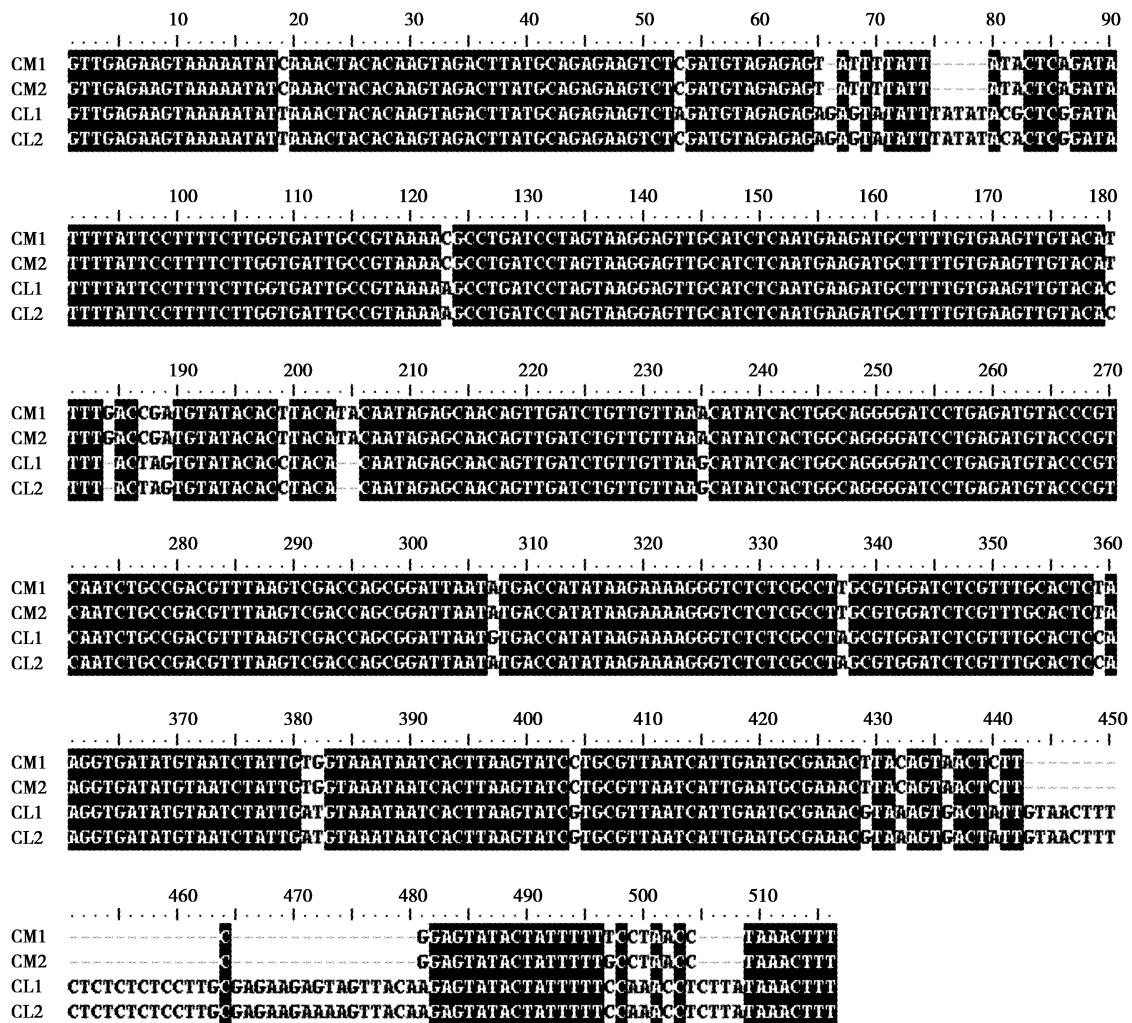


图1 针叶小爪螨板栗与杉木种群的 ITS2 序列比对

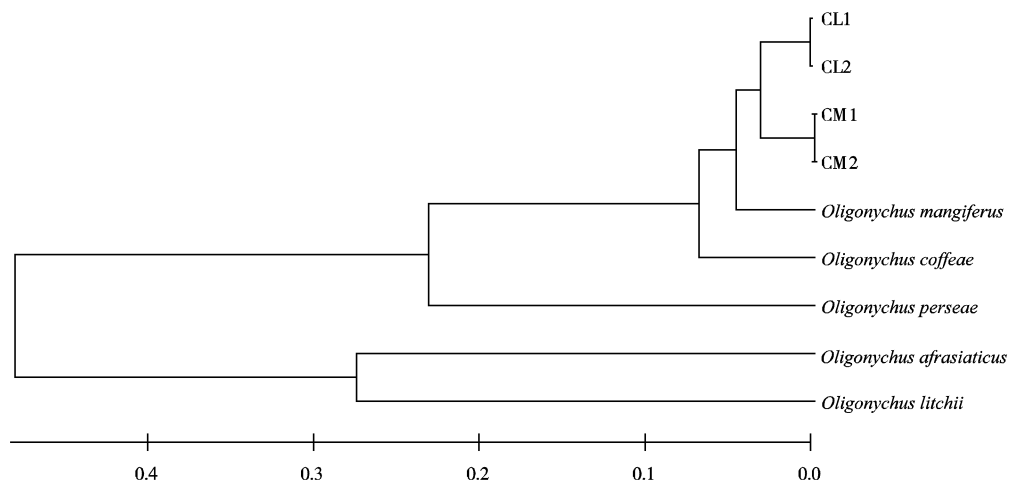
Fig. 1 Alignment of ITS2 sequences of the chestnut population and the fir population of *Oligonychus ununguis*

图2 小爪螨属部分种类基于 ITS2 序列构建的 UPGMA 系统树

Fig. 2 Molecular phylogenetic tree of species in the genus *Oligonychus* using UPGMA method based on ITS2 sequences

2. 2 CO I 的分子数据

测得板栗种群 4 个个体、杉木种群 3 个个体的线粒体 COI 基因中央部分的一个片段，长度均为 410 bp (GenBank 登录号为 GU166395 – GU166401)。通过与 GenBank 中 *Ixodes acutitarsus* 的 mtDNA-COI 基因全序列 (GenBank 登录号：AB105166) 进行比较，得知序列的第一个碱基是前一个氨基酸密码子的第 2 位点，为分析方便，将第 1 和 2 个碱基去除，以 408 bp 长度的序列进行分析。碱基组成上，A，T，C 和 G 的平均含量分别为：30.5%，45.3%，10.2% 和 14.1%。A + T 含量较高，为 75.8%，其中密码子第 1 位点 A + T 含量为 53.7%，第 2 位点 A + T 含量为 64.7%，第 3 位点的 A + T 含量最高，达到 94.9%。第 3 位点 G 的含量最低，平均为 2.2%，T 的含量为最高，达到 61.8%。这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性，与其他叶螨和昆虫的线粒体 DNA 碱基组成一致 (Simon *et al.*, 1994; Navajas *et al.*, 1996a)。

板栗种群的 4 条序列完全一致，无种群内变异。杉木种群的个体间差异为 0 ~ 0.3%。将两种群序列与 Navajas 等 (1996b) 测得的采自法国意大利柏

Cupressus sempervirens 上的针叶小爪螨 (在此命名为“意大利柏种群”，缩写 CS) 的 COI 序列 (GenBank 登录号为 X80865) 进行比对，比对长度为 392 bp，结果见图 3。392 个位点中没有插入/缺失，共有 51 个变异位点，板栗与杉木种群间的差异 (10.5% ~ 10.8%) 大于两种群分别与意大利柏种群的差异 (CM 与 CS：7.4%，CL 与 CS：8.7% ~ 9.0%)。

表 2 针叶小爪螨板栗、杉木和意大利柏种群的种群内及种群间 CO I 序列相似性 (下三角) 及遗传距离 (上三角)

Table 2 The identity (lower triangle) and genetic distance (upper triangle) of CO I sequences within and between the chestnut population, the fir population and the Italian cypress population of *Oligonychus ununguis*

	CL1	CL3	CM	CS
CL1		0.003	0.116	0.095
CL3	0.997		0.113	0.092
CM	0.892	0.895		0.078
CS	0.910	0.913	0.926	

CS 为意大利柏种群的缩写；CL2 与 CL1 完全一致，未列出；4 条 CM 序列完全一致，只列出 1 条。图 3，4 同。CS is the abbreviation for Italian cypress population. CL2 sequence is identical with CL1 and not listed. Four CM sequences are identical, and only one is listed. The same for Figs. 3 and 4.

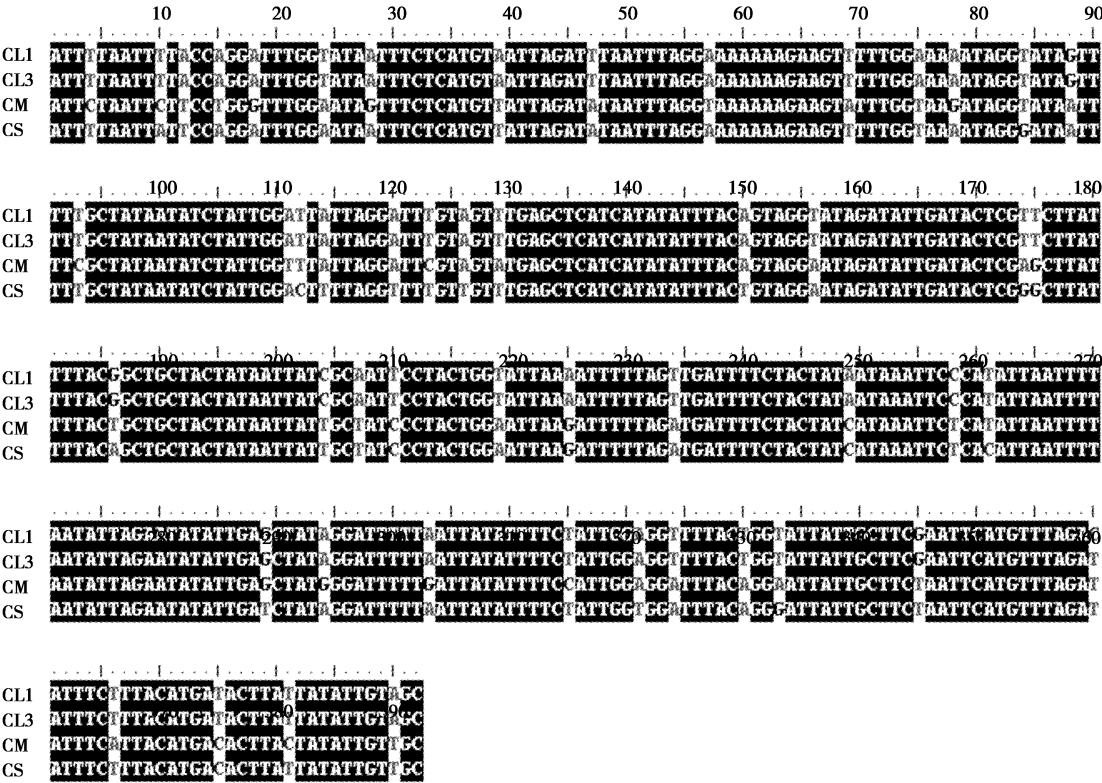


图 3 针叶小爪螨板栗、杉木和意大利柏种群的 CO I 序列比对

Fig. 3 Alignment of CO I sequences of the chestnut population, the fir population and the Italian cypress population of *Oligonychus ununguis*

将本研究所得 CO I 序列与意大利柏种群的 CO I 序列及 GenBank 公布的小爪螨属其他种 (*O. platani* (X80866)、*O. perseae* (DQ656485)、*O. afrasiaticus* (DQ656482)、*O. gossypii* (X80862)) 的 CO I 序列, 基于 Kimura-2-Parameter 模型构建 NJ, ME 和 UPGMA 系统树, 3 种系统树的拓扑结构相似, 在本文中只显示 UPGMA 树(图 4)。从图中可以看出, 根据 CO I 片段构建的系统发育树与 ITS2 不同, 板栗种群(CM)与杉木种群(CL)的亲缘关系较远, 而与意大利柏种群(CS)亲缘关系较近。板

栗种群首先与意大利柏种群聚在一起, 再与 *O. platani* 相聚, 然后才与杉木种群相聚。

2.3 杂交试验

针叶小爪螨以两性生殖为主, 也可营产雄孤雌生殖, 即未受精的雌螨只产雄性后代, 而受精的雌螨可产两性后代。板栗与杉木种群间杂交的所有雌螨都能够产卵, 卵的平均孵化率高于 96%, 但后代全部为雄性, 说明两种群间存在完全的生殖隔离, 结果提示板栗和杉木上的小爪螨可能是两个不同的种。

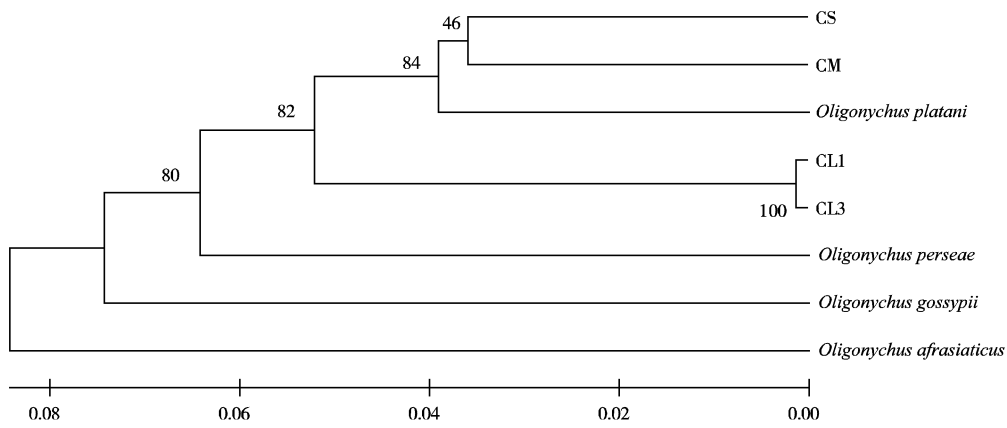


图 4 小爪螨属部分种类基于 CO I 序列构建的 UPGMA 系统树

Fig. 4 Molecular phylogenetic tree of species in the genus *Oligonychus* using UPGMA method based on CO I sequences

表 3 针叶小爪螨板栗与杉木种群的种群内及种群间杂交试验结果

Table 3 Results of cross-breeding experiments within and between the chestnut population and the fir population of *Oligonychus ununguis*

杂交 (♀ × ♂) Cross (Female × Male)	所用寄主 Hosts used	测试对数 Number of pairs tested	平均产卵量 Mean number of eggs	卵的平均孵化率 (%) Mean hatchability	幼若螨平均死亡率 (%) Mean mortality rate of immature mites	雌性后代比例 (%) Rate of female progeny
CL × CL	杉木 Fir	15	20.3 ± 1.1 a	97.7 ± 1.3 a	25.5 ± 1.1 a	68.4 ± 1.9
CL × CM	杉木 Fir	10	19.3 ± 0.7 a	98.1 ± 1.9 a	28.1 ± 1.6 a	0
CM × CM	板栗 Chestnut	24	20.6 ± 1.0 a	96.2 ± 2.3 a	28.2 ± 4.3 a	67.2 ± 6.2
CM × CL	板栗 Chestnut	13	25.4 ± 1.9 b	98.5 ± 0.9 a	28.6 ± 6.7 a	0

表中数值为平均值 ± 标准误; 采用 Duncan 氏新复极差法检验, 同列数据上标不同字母表示在 0.05 的水平上差异显著。Data in the table are mean ± SE, and the data followed by different letters in the same column are significantly different at the 0.05 level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

基于 CO I 和 ITS2 序列构建的小爪螨属不同种的系统发育树有差异: 在基于 ITS2 序列的系统树上, 板栗和杉木种群以较高的置信度(90%)聚在一起, 而在基于 CO I 序列的系统树上, 板栗种群

首先与意大利柏种群聚在一起, 再与 *O. platani* 相聚, 然后才与杉木种群相聚。出现这种不一致的情况, 可能与建树时采用的物种不同有关。因为现有数据库中, 小爪螨属的 CO I 和 ITS2 序列有限, 如: 意大利柏上的针叶小爪螨只有 CO I 序列没有 ITS2 序列, 因此无法保证采用相同的物种建树。

孙绪良等(2000)研究发现, 针叶小爪螨的杉

木种群与板栗种群间存在寄主隔离, 不能互相在对方的寄主上正常生存, 两种群间的杂交无雌性后代产生: 板栗种群雌螨与杉木种群雄螨杂交后代全部是雄性, 而反交雌螨未产卵。反交试验是在板栗叶片上进行的, 雌螨未产卵是由于生殖不亲和还是由于不取食板栗叶片、产卵前期未补充营养、性成熟不充分而造成的, 无法确定, 即两个种群间是否存在完全的生殖隔离还无法定论。本研究进一步完善了杂交试验, 将杉木种群雌螨与板栗种群雄螨的杂交放在杉木枝条上进行, 以保证雌螨正常取食。结果雌螨正常产卵, 但后代全部为雄性, 说明两种种群间存在完全的生殖隔离。分子数据表明, 两种群间的 ITS2 差异较大, 长度相差 44 bp, 核苷酸差异为 15.2% ~ 15.7%, 远远超过种群内差异 (0.3% ~ 1.0%)。ITS2 的长度及碱基组成在种内是很保守的 (Hillis and Dixon, 1991), 如: 采自 12 个国家 18 个不同地区的二斑叶螨的 ITS2 无差异; 采自巴西、哥伦比亚、刚果、贝宁 4 个国家的 *Mononychellus progresivus* 差异 0 ~ 0.25%; 山楂叶螨的法国与日本种群间差异 2.0%, 两个国家内不同地区间的个体无差异 (Navajas *et al.*, 1998)。而板栗、杉木上小爪螨的 ITS2 差异远远超过上述叶螨的种内差异, 也超过叶螨近缘种的种间 ITS2 差异: 1.2% (*T. pacificus* 与 *T. mcdanieli*)、1.7% (*T. urticae* 与 *T. pueraricola*) (Gotoh *et al.*, 1998)、1.3% (*T. urticae* 与 *T. kanzawai*) (Navajas *et al.*, 1998)、1.1% ~ 1.5% (*T. urticae* 与 *T. turkestanii*) (Ben-David *et al.*, 2007)、7.4% (*T. urticae* 与 *T. evansi*) (Knapp *et al.*, 2003)。另外, 板栗和杉木种群间的 CO I 差异 (10.5% ~ 10.8%) 也远远超过种群内差异 (0 ~ 0.3%), 而且也超过了其他叶螨的种内差异 [*Mononychellus progresivus*: 0 ~ 2.1% (Navajas *et al.*, 1994); 二斑叶螨: 6.2%、山楂叶螨 *Anphitetranynchus viennensis*: 3.6% ~ 3.9% (Navajas *et al.*, 1998)]、近缘种的种间差异 (*Tetranychus urticae* 与 *T. turkestanii* 差异 5%) (Navajas *et al.*, 1994), 接近不同属叶螨间的差异 (*M. progresivus* 与 *T. urticae* 间的差异为 11%) (Navajas *et al.*, 1994)。由此可见, 针叶小爪螨的板栗种群与杉木种群间的遗传分歧很大。两种群之间除了存在生殖隔离、核苷酸组成差异较大外, 在形态上 (雄螨外生殖器、雌螨生殖盖及生殖盖前区表皮纹、雌雄成螨足部各环节上的刚毛数及刚毛的种类、足 I 爪间突、须肢跗节端感器和背感器等)

也存在一些较为明显的差异 (另文发表)。综合这几个方面认为二者可能是两个不同的种, 但二者之间是否存在中间类型, 还需要进一步研究。

由板栗、杉木、意大利柏上针叶小爪螨的 CO I 序列间的遗传距离 (表 2) 及小爪螨属基于 CO I 序列建立的系统发育树 (图 4) 可以看出, 板栗种群与意大利柏种群间的遗传距离小于杉木种群与意大利柏种群间的遗传距离, 但二者间的 CO I 核苷酸差异也较大 (7.4%), 超过其他叶螨的种内 CO I 核苷酸差异 (二斑叶螨 (6.2%)、山楂叶螨 (3.6% ~ 3.9%) (Navajas *et al.*, 1998)、*M. progresivus* (0 ~ 2.1%) (Navajas *et al.*, 1994))。发育树上, 虽然板栗种群与意大利柏种群先聚在一起, 但置信度较低 (45%)。因此, 针叶小爪螨的中国板栗种群、杉木种群与法国意大利柏种群之间也出现了非常明显的遗传分化。

致谢 中国科学院动物研究所研究员、山东农业大学植物保护学院教授黄大卫为本研究提供试验条件; 山东农业大学动物科技学院王宁新老师给予试验操作上的指导并对文稿提出宝贵建议; 重庆市森林病虫害防治检疫站杨广海帮助采集标本。在此深表谢意!

参 考 文 献 (References)

- Anderson DL, Trueman JWH, 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 165 - 189.
- Ben-David T, Melamed S, Gerson U, Morin S, 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 41: 169 - 181.
- Czajkowska B, Ewa P, 2005. Spruce spider mite (*Oligonychus ununguis* Jacobi) and its predators associated with ornamental coniferous plants in Polish nurseries. *Bulletin OILB/SROP*, 28: 75 - 78.
- Czajkowska B, Kielkiewicz M, Puchalska E, 2003. Population parameters as an indicator of susceptibility of ornamental coniferous plants to spruce spider mite. *Journal of Plant Protection Research*, 43(2): 155 - 162.
- Gotoh T, Gutierrez J, Navajas M, 1998. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara *et* Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Sci.*, 1: 55 - 57.
- Hillis DM, Dixon MT, 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66: 411 - 453.
- Kielkiewicz M, Puchalska E, Czajkowska B, 2005. Changes in biochemical composition of needles of ornamental dwarf spruce (*Picea glauca* Conica) induced by spruce spider mite (*Oligonychus*

- ununguis* Jacobi, Acari: Tetranychidae) feeding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27: 463–471.
- Knapp M, Wagener B, Navajas M, 2003. Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *African Entomology*, 11: 300–304.
- Liu XH, Meng QY, Li ZX, Liu XF, Sun XG, 2007. Difference of bionomics of *Oligonychus ununguis* in four different host plants. *Forest Pest and Disease*, 26(1): 15–17. [刘学辉, 孟庆英, 李中新, 刘学峰, 孙绪良, 2007. 针叶小爪螨在四种寄主植物上的生物学特性差异. 中国森林病虫, 26(1): 15–17]
- Lu XY, Xu J, Li QY, 2008. Impact of *Lolium perenne* planted in chestnut orchards and its moving methods on population densities of *oligonychus ununguis* and its natural enemy *Amblyseius castaneae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 24(2): 108–111. [卢向阳, 徐筠, 李青元, 2008. 栗园种植黑麦草和不同刈割方式对针叶小爪螨及其天敌栗钝绥螨种群数量的影响. 中国生物防治, 24(2): 108–111]
- Navajas M, 1998. Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): Insights from molecular phylogeography. *Exp. Appl. Acarol.*, 22: 201–214.
- Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P, 1996a. Mitochondrial CO I sequences in mites: Evidence for variations in base composition. *Insect Molecular Biology*, 5(4): 281–285.
- Navajas M, Gutierrez J, Bonato O, Bolland HR, Mapangou-Divassa S, 1994. Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.*, 18: 351–360.
- Navajas M, Gutierrez J, Williams M, Gotoh T, 2001. Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangea*, shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding. *Bull. Entomol. Res.*, 91: 117–123.
- Navajas M, Gutierrez M, Lagnel J, Boursot P, 1996b. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull. Entomol. Res.*, 86: 407–417.
- Navajas M, Lagnel J, Fauvel G, De Moraes G, 1999. Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Exp. Appl. Acarol.*, 23: 851–859.
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P, 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial CO I polymorphism. *Heredity*, 80: 742–752.
- Noge K, Mori N, Tanaka C, Ritsuo N, Tsuda M, Kuwahara Y, 2005. Identification of astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. *Exp. Appl. Acarol.*, 35: 29–46.
- Pritchard AE, Baker EW, 1955. A Revision of the Spider Mite, Family Tetranychidae. Pacific Coast Entomological Society, San Francisco.
- Przygoda E, 2001. The occurrence of spruce spider mite (*Oligonychus ununguis* Jacobi) on ornamental coniferous plants in botanical gardens in Poland. *Annals of Warsaw Agricultural University*, 22: 23–29.
- Puchalska E, 2002. Preliminary studies concerning changes of photosynthetic activity of white spruce (*Picea glauca* ‘Conica’) infested by spruce spider mite (*Oligonychus ununguis* Jacobi). *Annals of Warsaw Agricultural University*, 23: 7–10.
- Puchalska E, Czajkowska B, Kielkiewicz M, 2008. Morphological, anatomical and chemical characterization of white spruce (*Picea glauca* ‘Conica’) differently aged needles and hypotheses on their influence on *Oligonychus ununguis* infestation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 225–232.
- Puchalska E, Tykarska T, Czajkowska B, 2006. Morphological and anatomical factors responsible for varied susceptibility of some species of spruce to infestation by spruce spider mite (*Oligonychus ununguis* Jacobi). *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 599–604.
- Richmond DS, 1996. Ecdysis time and spatial distribution of overwintering spruce spider mite (Acari: Tetranychidae) eggs on Colorado spruce. *Journal of Economic Entomology*, 89(2): 447–452.
- Salomone N, Frati F, Bernini F, 1996. Investigation on the taxonomic status of *Steganacarus magnus* and *Steganacarus anomalus* (Acari: Oribatida) using mitochondrial DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.*, 20: 607–615.
- Shinkaji N, 1975a. Seasonal occurrence of the winter eggs and environmental factors controlling the evocation of diapause in the common conifer spider mite, *Oligonychus ununguis* (Jacobi) on chestnut. *Journal of Applied Entomology and Zoology*, 19: 105–111.
- Shinkaji N, 1975b. Hatching time of the winter eggs and termination of diapause in the common conifer spider mite, *Oligonychus ununguis* (Jacobi) on chestnut in relation to temperature. *Journal of Applied Entomology and Zoology*, 19: 144–148.
- Shrewsbury PM, Hardin MR, 2003. Evaluation of predatory mite (Acari: Phytoseiidae) releases to suppress spruce spider mites, *Oligonychus ununguis* (Acari: Tetranychidae), on juniper. *Journal of Economic Entomology*, 96: 1 675–1 684.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651–701.
- Sun XG, Miao L, 1990. Studies on *Oligonychus ununguis* (Jacobi). *Journal of Shandong Agricultural University*, 21(3): 41–46. [孙绪良, 苗良, 1990. 针叶小爪螨研究初报. 山东农业大学学报, 21(3): 41–46]
- Sun XG, Xu CQ, Zhou CG, Yin SY, Zhen WQ, 2000. Performances and reproductive isolation of different populations of *Oligonychus ununguis* (Jacobi) on conifer and broadleaf trees. *Acta Entomologica Sinica*, 43(1): 52–57. [孙绪良, 徐常青, 周成刚, 尹淑艳, 甄文全, 2000. 针叶小爪螨不同种群在针叶树和阔叶树上的生长发育和繁殖及其生殖隔离. 昆虫学报, 43(1): 52–57]

- Sun XG, Yin SY, 2002. Studies on the interrelationship among *Oligonychus ununguis*, host plants and *Amblyseius finlandicus* II. The effects of volatile on the correlation of host plants-*Oligonychus ununguis*-*Amblyseius finlandicus*. *Scientia Silvae Sinicae*, 38(2): 73–77. [孙绪良, 尹淑艳, 2002. 针叶小爪螨-寄主植物-芬兰钝绥螨相互关系的研究 II. 挥发性物质在寄主植物-针叶小爪螨-芬兰钝绥螨之间的作用. 林业科学, 38(2): 73–77]
- Sun XG, Yin SY, Li B, 2002. Studies on the interrelationship among *Oligonychus ununguis*, host plants and *Amblyseius finlandicus* I. The olfactory responses of *Oligonychus ununguis* to host plants and *Amblyseius finlandicus* to preys. *Scientia Silvae Sinicae*, 38(1): 76–81. [孙绪良, 尹淑艳, 李波, 2002. 针叶小爪螨-寄主植物-芬兰钝绥螨相互关系的研究 I. 针叶小爪螨对寄主植物和芬兰钝绥螨对猎物的嗅觉反应. 林业科学, 38(1): 76–81]
- Sun XG, Zhou CG, Zhang XD, Liu YM, 1994. Preliminary studies on damage of *Oligonychus ununguis* (Jacobi) on Chinese chestnut and its control index. *Journal of Shandong Agricultural University*, 25(2): 202–206. [孙绪良, 周成刚, 张小娣, 刘玉美, 1994. 针叶小爪螨对板栗的危害及防治指标初步研究. 山东农业大学学报, 25(2): 202–206]
- Sun XG, Zhou CG, Zhang XD, Liu YM, 1995. A study on the diapause of *Oligonychus ununguis* (Jacobi). *Acta Entomologica Sinica*, 38(3): 305–311. [孙绪良, 周成刚, 张小娣, 刘玉美, 1995. 针叶小爪螨的滞育研究. 昆虫学报, 38(3): 305–311]
- Vargas M, Garcia-Varlea M, Lacleste JP, Perez TM, 2005. Application of ITS-2 sequences as markers for identification and phylogenetic inference within the genus *Geomylichus* (Acari: Listergidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 35: 223–238.
- Vera ID, Ros Johannes AJ, Breeuwer, 2007. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial CO I phylogeny reviewed; Host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp. Appl. Acarol.*, 42: 239–262.
- Wang HF, 1981. Economic Insect Fauna of China, Fasc. 23. Acariformes; Tetranychoidae. Science Press, Beijing. 104–106. [王慧芙, 1981. 中国经济昆虫志第23册螨目叶螨总科. 北京: 科学出版社. 104–106]
- Wang YM, Wang YN, Xu J, 1989. Seasonal occurrence and control of spruce spider mite, *Oligonychus ununguis* (Jacobi) on chestnut trees. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 4(4): 98–140. [王源岷, 王英男, 徐筠, 1989. 板栗树针叶小爪螨发生规律及其防治研究. 华北农学报, 4(4): 98–140]
- Wanibuchi K, Saito Y, 1983. The process of population increase and patterns of resource utilization of two spider mites, *Oligonychus ununguis* (Jacobi) and *Panonychus citri* (McGregor), under experimental conditions. *Researches on Population Ecology*, 25: 116–129.
- Yin SY, Sun XG, 2002. Studies on the interrelationship among *Oligonychus ununguis*, host plants and *Amblyseius finlandicus* III. Relationship between chemical component of host plants and development of *Oligonychus ununguis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 38(4): 105–110. [尹淑艳, 孙绪良, 2002. 针叶小爪螨-寄主植物-芬兰钝绥螨相互关系的研究 III. 寄主植物的化学组成与针叶小爪螨生长发育的关系. 林业科学, 38(4): 105–110]
- You ZH, Lu H, Zhang XS, Feng JN, Shi BC, Gong YJ, Huang DW, 2007. Molecular identification of the introduced western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and other eight common thrips species (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 720–726. [游中华, 路虹, 张宪省, 冯纪年, 石宝才, 宫亚军, 黄大卫, 2007. 入侵害虫西花蓟马及其他8种常见蓟马的分子鉴定. 昆虫学报, 50(7): 720–726]
- Zhang SM, 1983. Preliminary observation on *Oligonychus ununguis* (Jacobi). *Practical Forestry Technology*, (3): 30–32. [张时敏, 1983. 针叶小爪螨初步观察. 林业实用技术, (3): 30–32]

(责任编辑: 袁德成)